

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : 04-034969

(43) Date of publication of application : 05.02.1992

(51) Int.Cl.

H01L 27/092
H01L 23/62
H01L 27/04
H01L 27/08

(21) Application number : 02-140771

(71) Applicant : NISSAN MOTOR CO LTD

(22) Date of filing : 30.05.1990

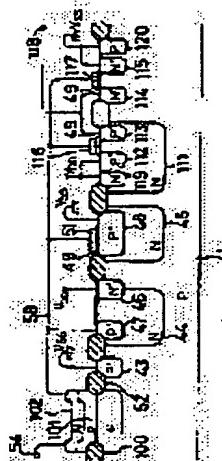
(72) Inventor : TAJIMA YUTAKA

(54) SEMICONDUCTOR DEVICE

(57) Abstract:

PURPOSE: To prevent the latch up circuit from being made while integrating the circuit by a method wherein the first region is provided with the larger band gap or higher recoupling level than those of the second region.

CONSTITUTION: A P type porous silicon layer 100 is formed on the main surface of a P type substrate 41; an N-type polycrystal silicon layer 102 is formed on the main surface of the P type porous silicon layer 100 through the intermediary of a P type polycrystal silicon layer 101; one end of the P-type polycrystal silicon layer 102 is connected to an input terminal while the other end is connected to the gate of CMOS. Through these procedures, since the numbers of electrons implanted in the P-type substrate 41 to reach an N well 111 can be reduced, the latch up circuit can be prevented from being made without widening the chip space. Furthermore, the insulation breakdown will not occur since there is no insulating film between the N-type silicon layer 102 and the P-type substrate 41. Accordingly, an input protective circuit can be made without deteriorating the surge yield strength of the N-type polycrystal silicon layer 102 as an input resistor.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑱ 特許公報 (B2)

平4-34969

⑲ Int. Cl.	識別記号	序内整理番号	⑳ ㉑ 公告 平成4年(1992)6月9日
A 61 K 31/35 7/00	ADT	7475-4C	
7/06	ADU K	9051-4C	
35/78	AGA X	9051-4C	
// C 07 D 311/60	ADN	7038-4C	
	ADD C	7180-4C	
		6701-4C	

発明の数 1 (全9頁)

㉒ 発明の名称 細胞賦活能、免疫賦活能を有する活性酸素捕捉除去剤

㉓ 特 願 昭62-207236 ㉔ 公開 平1-50877
 ㉕ 出 願 昭62(1987)8月20日 ㉖ 平1(1989)2月27日

㉗ 発明者 丹羽 利 負 高知県土佐清水市旭町4-4

㉘ 発明者 安藤 裕 岐阜県大垣市三塚町998番地

㉙ 発明者 松井 建次 岐阜県岐阜市加野1667番地の7

㉚ 発明者 坪井 誠 岐阜県大垣市宮町1丁目25番地

㉛ 出願人 一丸ファルコス株式会社 岐阜県山県郡高富町高富337番地

審査官 佐伯 とも子

1

2

㉗ 特許請求の範囲

1 バイカレイン又はバイカレインを含む抽出物を用いることからなる、細胞賦活能、免疫賦活能を有する活性酸素捕捉除去剤。

発明の詳細な説明

〔1〕 発明の目的及び産業上の利用分野

本発明は、黄芩：オウゴン中に含まれるフラボイド系成分（バイカレインなど）、又はバイカレインを含む抽出物に係る新規な応用（利用）に関する。

すなわち、本発明による上記成分は、活性酸素（Oxygen radicals）：OR(O⁻², H₂O₂, OH⁻, 化学ルミネセンス）の捕捉、及び除去作用を有し、よつて、医療品分野、又は化粧品分野（医薬品外品を含む）の処方中の系に配合し、活性酸素捕捉除去剤として利用することができる。

〔2〕 従来の技術

Ⓐ 活性酸素：ORの及ぼす影響

活性酸素（以下、便宜上ORと略記する）は、O⁻², H₂O₂, OH⁻, 化学レミネセンスの四種を主体となし、生体等における、さまざまな反応と、その影響等について研究が続けられてきている。

例えば、細菌・ウイルス、異物などの外敵が、生体内へ侵入すると、まず、血液中の食細胞である好中球・単球・マクロファージが、進入した外敵に対して、貧食作用を開始し、貧食に引き続

5 き、食細胞の胞体中に貧食された異物類を溶解させるために、ORの生産がなされる。ORは、このとき、貧食物を融解する他、直接的に、細菌や異物に対して、強力な細菌作用を及ぼし、生体の自己防衛に当る。

10 しかし、この場合、食細胞が過度に刺激されると、ORや、ライソゾーム酵素の産生・分泌が増加され、その結果、さまざまな弊害を生体に与えることとなる。

すなわち、ライソゾーム酵素による組織障害は、古くから知られているが、この場合、増加したORによつても、高度な組織障害がもたらされ、近年、生体で増殖されたORによる疾病が、数多く明らかにされてきている。

例えれば、皮膚とORの関係についてみれば、皮20 膚は、直接的に外界と接触する器官であるために、それらの環境因子の影響を受けやすい状態にある。ORが皮膚に過剰な状態で存在すれば、その結果は、不飽和脂肪酸と反応して、過酸化脂質

を増加させる。又、化粧品や外用剤などにおける製剤にあつては、その系（処方中）において油脂を含むため、ORの作用によつて、過酸化脂質を生成し易い状態にある。これらの生成された過酸化脂質は、動脈硬化、発癌、老化、膜の破壊、蛋白変性、溶血などの有害な作用の引き金となり、皮膚に対しては、炎症、浮腫、壞死、色素沈着などを引き起こす。

このために、各疾患に深く係わるORを除去すること、すなわち、ORの過剰によつて起こる、疾病に対して、その治療及び予防に当つて、優れた、OR捕捉除去物質が求められ、その検索が続けられてきた。

(B) OR捕捉除去物質の調査

ORの捕捉除去能を有する物質としては、動・植物の生体におけるSOD(スーパーオキサイドダムターゼ)や、カタラーゼ、グルタチオンペーオキシダーゼの存在が知られている。

例えば、SODは、生体内にあつて、 O_2^- を特異的に消費する酵素としてよく知られている。SODやカタラーゼと同様に、ORのスカベンジャーとしては、トコフェロールや、抗酸化剤として知られる、BHA、BHTなどがある。又、天然物由来の成分としては、上述したトコフェロール(ビタミンE)、ケルセチン、ルチン、カンフェロール、ミリセチン、フイセチン、モリンなどのフラボノイドが知られている。

(C) OR捕捉除去物質の応用(利用)分野

ORの捕捉除去能を有する物質の応用分野としては、例えば、化粧品、あるいは医薬用外用塗布塗擦剤(医薬部外品を含む)に用いれば、皮膚の老化現象の予防剤となる。

例えば、皮膚(肌)に対して、その紫外線照射部は、これにともなつて、ORの産生、ひいては過酸化脂質の産生が高まり、同時に組織障害やメラニン形成を助長し、その結果、小皺、シミの発生が高まると言われている。したがつて、OR捕捉除去剤は、これを外用塗布等の剤形の処方中に配合すれば、美肌効果が得られ、とくに露出した顔面等に、塗布、塗擦することは、日光によるシミやソバカスなどに対する、色素沈着を防ぎ、又、その治療にも応用可能となる。

ORの過剰により起こる疾病としては、この他、疱瘍状皮膚炎、線状免疫グロブリン水疱性皮

膚疾患 (linear IgA bullous dermatosis)、重症のセメント皮膚炎、レントゲン皮膚炎、火傷、外傷、日光皮膚炎、接触性皮膚炎、主婦湿疹、アトピー皮膚炎、湿疹、ペーチエット病等が知られ、

5 これららの炎症には、過酸化脂質の産生と共に、プロスタグランジなどの産生も深く係わっていることが知られている。又、火傷などの場合、ORの上昇が抑制されれば、ケロイド形成に発展せず、瘢痕形成程度に、症状を軽減することが可能であるとされている。

又、ORの過剰な生成がともなう疾患としては、この他、発症5日以内の状態にある川崎病、心筋梗塞、脳外傷時の血管障害の悪化、科学物質による肺、心などの組織障害や硬化、糖尿病の増悪などが知られ、さらに、ORによる慢性の刺激は、発癌の重要なプロモータとなるとされている。

さらに、ORの増加により増悪する自己免疫疾患としては、皮膚はえうじ症、クローン氏病、悪性関節リウマチ、潰瘍性大腸炎疾患などが知られている。

一方、ORの生成と、過酸化脂質の産生との間には深い関連があると考えられている疾患には、白内障、肺硬化症、肺気腫、気管支の損傷(bronchial damage)など、そして、前述したことく、シミ、ソバカスなどの、皮膚の異常な色素沈着症状などがある。過酸化脂質の産生は、メラニン色素の形成を増強するとされ、又、顔面の色素異常沈着症は、ORの産生が直接的に、メラニン形成を促進して起こる場合もあると、言われている。

又、脾臓、小腸は、キサンチンオキシダーゼに富む。このために、ORによる組織障害が発生し易い状態にあり、その結果、糖尿病になりやすい。さらに、脳、心臓における、動脈硬化による血管障害(例えば、脳卒中、心筋梗塞)や、脳外傷時などにおいては、血栓などによる血流障害や、急激な一過性の血管の萎縮による血管内の、虚血状態をまねき、そのため酸素欠乏状態となる。この状態は、血管内のキサンチンデヒドロゲナーゼが、キサンチンオキシダーゼに変化し、血管内の血流中に、大量のORを発生させ、血管壁の損傷に致命的なダメージを与えるとされている。さらに、ポルフィリン代謝異常にについてみれ

ば、例えば、皮膚ポルフィリン症にあつては、ポルフィリン体が増加し、紫外線によつて、ポルフィリン体により、大量のORや過酸化脂質が产生し、これによつて、組織障害やメラニン形成を助長するとされ、この際、ORの生成が皮膚癌のプロモーターとして、働くことなどのことが知られている。

(D) OR捕捉除去剤の開発状況

前記(A)～(C)で述べたごとく、OR捕捉除去能に優れた物質は、各種の疾患の治療や予防に利用可能であるとされ、さまざまな薬剤の開発が活発に進められてきている。そして、例えば、SODを用いた、その分野への応用が、いくつか提案されてきた。

しかし、SODは、大変不安定な物質であり、化粧品等の処方中の系において、製剤化が容易でなく、その効果を発揮するためには、種々の安定化法が考えられてきた。例えば、マイクロカプセル化、リポソーム化等による製剤化も提案されている。

(3) 発明が解決しようとする問題点

これまでに知られている、OR捕捉除去能をもつた物質のはほとんどは、細胞膜の代謝系において、影響（作用）を与えないか、又は、逆に代謝を若干、低下させる傾向を示すもの多かつた。

しかし、ORの生成を含む食細胞の活性、代謝においては、その抑制は、生体にとって不利益となる。すなわち、好中球・リンパ球細胞の代謝系においては、増強させる作用をもつた、OR捕捉除去物質が望ましい。しかし、これまで、そのような物質は少なかつた。

本発明者らは、SODの不安定な欠点を補い、さらに、SOD以上に、すなわち、SODの作用（働き）ステップとしては、 O_2^- を、 O_2 と H_2O_2 に変換させる酵素であつて、次にカタラーゼにより、 H_2O_2 を、 H_2O と O_2 となす生化学的な反応機序があるが、ここでは、広く、 O_2^- のみならず、 H_2O_2 、 OH^- 、化学ルミネセンスを除去し、しかも、他のスカンベンジャーには、ほとんど見られない、食細胞の活性をはじめ、各細胞の活性（代謝）も増強できる物質を求めるこを、その開発のテーマとなし、鋭意、研究に当つた。

つまり、本発明の解決せんとなす問題点は、数多い天然産物のなかから、前述した4種のORの

産生に対して、これを低下（抑制）させる作用を有し、同時に、食細胞、及び各細胞の代謝に対しては、これを低下（抑制）することがないことを条件となし、過剰に產生されるORを、生体内で除去することの出来る、スカンベンジャー作用（SOD様作用）物質を見出すことにあつた。

本発明者は、この目的（テーマ）をもとに、コツコツと地道な検索を続けてきた。

その結果、オウゴンから得られた抽出物（オウゴンエキストラクトパウダー）が優れたOR捕捉除去作用を有することを見出し、本発明に至つたのである。

その間、本発明者らは、すでに次表（第1表）に示すごとく、オウゴンから得られる抽出物に関し、種々の応用開発を続けてきたが、本発明によつて、オウゴンの利用分野は、さらに拡大されることとなつた。

「第1表」 オウゴンに係る刊行物の所在

	刊行物の所在	要旨（※印は本願出願時点未公開）
イ	公開特許公報昭61-50918（特許願昭59-173537）	バイカリーン又はバイカレイン含有液、それを配合した皮膚外用剤、又は皮膚化粧料。
ロ	公開特許公報昭61-50921（特許願昭59-173538）	バイカリーンの精製化法。
ハ	特許出願昭61-170551（特開昭63-27435号）	バイカレイン高含有エキスの抽出法。※
ニ	特許出願昭61-227497（特開昭63-83017号）	バイカレイン、バイカリーン等を用いた日焼け防止用化粧料。※
ホ	特許出願昭62-086362（特開昭63-253013号）	バイカレイン、バイカリーンを用いたメラニン生成抑制剤。※

(4) 発明の構成

本発明は、黄岑：オウゴン（シソ科植物であるコガネ花の根）から得られた、バイカレイン、又は、バイカレインを含む抽出物をもつて、OR捕捉除去剤として用いることからなる。

以下に、本発明について、具体的に示すために、その試験法と共に、成績結果等を示し、詳記する。

(A) 成分(物質)の特定

本発明によるOR捕捉除去剤は、上記したごとく、オウゴン由来の抽出物であつて、バイカレインを含むことを特徴とするが、バイカレインの他、オウゴン中に含まれるフラボノイド系成分、その他の成分が混在した抽出物からなる。

その抽出法としては、前記第1表中(i)～(iv)に示す方法によつて得ても良く、又、以下に示す方法により得られた、抽出物を用いても良い。又、これらの方法にこだわることなく、他の公知な抽出法をもとに得られた、抽出物を用いても良いが、その際、得られた抽出物において、フラボノイドとして少なくとも、バイカレイン、又はバイカリシン(バイカリシンは、バイカレインの配糖体)を含むことを必須となす。

(B) 抽出法(製造法)

オウゴン末100gに、精製水600mlを加え、50°で3時間の前処理浸漬を行う。この操作を終了した後、浸漬液に対して、1.8ℓのアルコール(エタノール又はメタノールなど)を加え、浸漬抽出、又は、加温下で抽出を行い、その滤液を得る。この滤液に、ナイロン(ポリアミド、セルロース、又はキトサンをそのままか、あるいは、有機酸を加えて用いる)を加えて処理し、滤過した後、この滤液1部に、精製水2部を加える。これによつて、黄色エキス末が析出してくるので、これを得て乾燥し、オウゴン抽出物(オウゴンエキストラクトパウダー)約10gを得る。

(C) 抽出物の特徴

前記(B)で示す抽出法によつて得られた、オウゴン抽出物は、次表(第2表)及び、第1図に示すことく、バイカレインを主体に含む抽出物であり、他に、オウゴニン等が確認される、尚、第1図は、高速液体クロマトグラフによるチャートであり、その試験法は、次の条件を用いて実施した。

「高速液体クロマトグラフー測定条件」

カラム；LS-410(ODS)、4.6mm×25cm。溶離液；アセトニトリル43：水27：0.6%リン酸30。

流量；1.0ml/min。カラム温度；40°C。検出；紫外部280nm。

「第2表」抽出物の性状
及び成分

項目	数値等
性状	本品は、黄色の粉末でエタノール、又はエタノールと水の混液中に溶解するも、水には不溶である。
定量	バイカレイン 53%
その他の確認成分	オウゴニンなど

(D) 作用又は効果

本発明による、OR捕捉除去剤に係る作用を、具体的に示すために、前記(C)において示す抽出物(オウゴンエキストラクトパウダー)を用いて行なつた成績結果は次表第3～6表に示すごとくであるが、まず、本発明による、その作用又は効果について、これを要約すれば、次のごとくである。

① 本抽出物は、細胞系のみならず、キサンチンーキサンチンオキダーゼ系で生成された、4種のORのいずれについても、これを低下させる。又、メチルトランスフェラーゼと、ホスホリバーゼA₂をはじめ、各細胞の代謝を低下させることなく、過剰に生成されるORを、生体内で除去する、スカベンジャー作用を有していること。そして、その作用は、強力であること。

② とくに、細胞系、キサンチンーキサンチンオキシダーゼ系共に、H₂O₂は、完全に除去されたこと。

③ 又、過酸化脂質形成抑制作用についても、その効果が認められたこと。

④ すなわち、本抽出物は、他の例にない強力な細胞賦活作用を有したOR捕捉除去剤として評価され、免疫賦活能を有し、各種の癌の予防と治療、あるいは、他の抗癌剤との併用によつて、それらの物質の副作用を抑制し、又、抗癌剤としての利用が可能である。

「第3表」ヒト好中球系に対するOR測定結果

系中の添加濃度 ↓	O ₂ n mol/10 ⁶ PMN/min.	H ₂ O ₂ p mol/2.5×10 ⁶ PMN/min.	OH [·] p mol/3×10 ⁶ PMN/min.	化学ルミネンス 10 ⁴ CPM/2.5×10 ⁶ PMN
10 ⁻⁶ M	0.85±0.09	431±74	311±31	22.6±2.9
10 ⁻⁵ M	0.41±0.04	167±20	175±15	18.7±2.2
10 ⁻⁴ M	0.62±0.06	0±0	47.1±5.6	11.4±1.0
対照※	1.62±0.19	478±43	575±63	25.1±2.7
備考	1 mg/mlオブソニン処理し、ザイモサンで刺激された好中球より生成された活性酸素(OR)に対する、オウゴンエキストラクトパウダーの効果を示す。 ※……対照は、オウゴンエキストラクトパウダー無添加により生成したORを示す。			

「第4表」キサンチンーキサンチンオキシダーゼ系に対するORの測定結果

区分	O ₂ n mol/min.	H ₂ O ₂ p mol/min.	OH [·] p mol/min.
系中の添加濃度 ↓	n mol/min.	p mol/min.	p mol/min.
10 ⁻⁶ M	8.56±0.94	812±89	1562±171
10 ⁻⁵ M	4.32±0.46	615±61	776±68
10 ⁻⁴ M	2.02±0.18	0±0	892±107
対照※	11.8±1.2	972±116	2012±221
備考	※……対照は、オウゴンエキストラクトパウダーを添加しないときのORを示す。		

「第5表」過酸化脂質形成に対する影響
の測定結果(ドコサヘキセノイツクアシドによる)

ドコサヘキセノイツクアシド	オウゴンエキストラクトパウダー	TBA反応値
—	—	0.000
+	—	0.812±0.089 (コントロール値)
+	10 ⁻⁶ M	0.74±0.08
+	10 ⁻⁵ M	0.69±0.07
+	10 ⁻⁴ M	0.63±0.06
備考: 535nmにおける吸光度を測定。		

「第6表」 ヒト好中球及びリンパ球細胞膜の
酵素活性測定の結果(メチルトラン
スフェラーゼ&ホスホリバーゼ
 A_2 活性能)

区分	メチルトランスフェラーゼ		ホスホリバーゼ A_2		
	p mol/mg protein/min.	% arachidonate release	リンパ球	好中球	
細胞膜⇒	リンパ球	好中球	リンパ球	好中球	
添加濃度	10 ⁻⁶ M	4.23 (±0.46)	3.88 (±0.38)	12.8 (±1.4)	8.6 (±0.9)
	10 ⁻⁵ M	8.56 (±0.94)	7.95 (±0.95)	17.5 (±2.1)	12.1 (±1.5)
	10 ⁻⁴ M	12.3 (±1.35)	10.8 (±1.08)	24.1 (±1.4)	18.6 (±2.2)
	対照※	0.81 (±0.07)	0.64 (±0.07)	7.4 (±0.8)	4.5 (±0.4)
備考	活性化された人リンパ球、好中球膜200 μg/蛋白と、[³ H-メチル]-S-アデノシルメチオニン、又は、[1- ¹⁴ C]アラキドン酸誘導体とを用いて、膜活性リン脂質酵素活性について測定。 ※……対照は、オウゴンエキストラクトの無添加による。				

(E) 作用又は効果に係る試験法の注解

① 第3表に係る試験法：OR(O_2^- , H_2O_2 , 25

OH^- 、化学ルミネセンス)のヒト好中球系に対する、活性酸素(OR)の生成に係る影響の測定法は、後記する文献(1)～(2)による方法に従い、静脈血より分離した。1 mg/mlオブソニンで処理した、ザイモザン刺激健康人好中球(pseudomorph homonuclear leukocyte: PMN)とともに、5%グルコース含有クレブスリンガーリン酸緩衝液(但し、化学ルミネセンス測定時には、無色のハンクス液を使用)に浮遊させ、PMN培養液を作製。

PMNは、フィコールハイバキユグラディエントデンシティ法により、PMN含有層を分取、更にPMN含有層を被検血清と、分子量17×10₄の、6%デキストラン生理食塩水で希釈処理し、0.876%塩化アンモニウムで混入赤血球を溶血。

PMN刺激に使用したザイモザンは、文献(1)～(2)に従い、前もって被検血清をオブソニン処理した。

ORの内、 O_2^- はチトクロムの還元により、ベックマンのスペクトロメーターで測定。

H_2O_2 は、スコボレチンの蛍光減少度を、蛍光分光光度計(日立MPF4型)により測定。

OH^- は、α-ケト- α -メチオルブチリツクアシド(KMB)を加え、エチレンガスの産生を、ガスクロマトグラフ(日立)により測定。

化学ルミネセンスは、厳重な遮光のもとに、液体シンチレーションカウンター(パッカード、イリノイ、USA)を用いて測定。

② 第4表に係る試験法：キサンチン-キサンチノキシダーゼ系のOR生成能試験については、50 ml生理食塩水に溶解した、13.5 mgヒボキサンチン0.1 mlと、2.3 mlの生理食塩水に溶解した50 mMのEDTA 0.05 ml、及び0.7 μgキサンチノキシダーゼ0.1 mlを混合し、この混合液0.1 mlを、さらに2 ml、リン酸カリウム緩衝液に希釈溶解して、ORを产生。

O_2^- , H_2O_2 , OH^- の測定は、前記①(第3表)の測定法に従い行つた。

(測定法に関する文献所在)

- (1) 丹羽ら：プラット（Blood）第64巻、p.994～999(1984)
- (2) 丹羽ら：アーチ ダーマトール（Arch Dermatol）第121巻、p.73～78(1985)
- (3) 第5表に係る試験法：ドコサヘキセノイツクアシド過酸化脂質形成能の測定においては、オウゴンエキストラクトパウダーを加え、20時間インキュベートした後、0.67%チオバルビツル酸（TBA）：酢酸の1：1の混液を加え、95℃、45分間加熱。水冷後、n-ブタノールを加え、1250×gで10分間遠心分離。n-ブタノール層を用い、蛍光分光光度計（日立MPF4型）により測定。
- (4) 第6表に係る試験法：ヒト好中球及びリンパ球細胞膜酵素活性（賦活）能の測定は、次の方法により行った。

好中球膜、リンパ球膜のミクロソームフラクションの作成

健康人未梢血より好中球、リンパ球をフィコール・ハイパキュ（Ficoll-Hyque：和光純薬製）により、それぞれ分離した後、0.25Mシユクロースを加え、氷水中で10秒間、超音波24W処理。次に、4℃、14000×g、10分間、遠心分離した後、その上清を、4℃、140000×g、60分間、超遠心分離し、ミクロソームフラクションを沈渣として得て、これを0.25Mシユクロースに浮遊する。

メチルトランスフェラーゼ活性

100mMトリス塩酸（pH8.0）、0.1mMエチレン*

$$\frac{\text{分離した}\beta-[^{14}\text{C}]\text{アラキドン酸}}{\beta-[^{14}\text{C}]\text{アラキドニルPC+分離した}\beta-[^{14}\text{C}]\text{アラキドン酸}} \times 100$$

PC……ホスマチジルコリン

(F) 作用又は効果に関する考察

オウゴン及びオウゴン中に含まれる成分について、OR捕捉除去作用（SOD様作用）を有するととの報告は、これまで、まつたく知られていないなかたが、本発明者は、前記した試験（検索）法を採用して、その結果、第3～5表に示す成績をもつて、オウゴン抽出物は、優れたOR捕捉除去剤であることを見出した。この優れたOR捕捉除去剤としての、オウゴン抽出物の作用機序について、得られた成績結果をもとに、二～三の考察を加えながら、さらに説明すれば、第6表に示すごとく、好中球・リンパ球共に、その細胞膜のメチレ

- *グリコール-β-アミノエチルエーテル-N,N',N'-テトラ酢酸（EGTA）50μMのS-アデノシル-L-[³H-メチル]メチオニン（[³H-SAM] 2μCiと、ミクロソームフラクション 5 200μg／蛋白を混和し、37℃で30分間インキュベート。次に、0.25N塩酸0.6mlにて反応を止め、クロロホルムを用いて、リン脂質成分を抽出後、膜リン脂質成分に取り込まれた [³H-メチル]を、シンチレーションカウンター（バッカード、10 イリノイ、USA）で測定。

ホスホリバーゼA₂活性

ミクロソームフラクション200μg／蛋白を0.25Mシユクロースに懸濁し、10μl (0.5μCi) $\beta-[^{14}\text{C}]$ アラキドニルPC ($\beta-[1-^{14}\text{C}]$ アラキドニール-α'-ステアリル-L-d-フオスファチジルコリン) (Amersham, 59.3mCi/nmol) を加え、30℃、90分間インキュベート。1.5mlのクロロホルム-メタノール（2：1）混液を4℃で加えて反応を止め、2000×g、5分間の遠心分離により、クロロホルム層を得る。

クロロホルム層を30℃の減圧下で乾燥した後、クロロホルム-メタノール（2：1）混液を加え、TLCにスポットし、石油エーテル；エーテル；酢酸（80：30：1）の混液により展開。分離した $\beta-[^{14}\text{C}]$ アラキドン酸を、シンチレーションカウンターで測定し、下記式により、遊離アラキドン酸を百分率で求める。

（算式）

ーションをはじめ、ホスホリバーゼA₂についても、著明に上昇させる。このような、高値を示す物質は、極めて稀である。これは、メチルトランスフェラーゼが活性化されると、内外膜の外転、即ち、トランスロケイションが起こり、細胞膜の粘稠度の低下、そして、流動性の亢進がもたらされるものとなり、さらに、これによつて、引き続きホスホリバーゼA₂が活性化され、アラキドン酸カスケードが回転し、ORの產生、ライソソーム酵素の分泌、遊走運動能、貧食作用等の亢進が起こり、細胞の代謝活性（反応性）が増強されたと考えられる。すなわち、オウゴンエキストラクトパウダーは、食細胞をはじめ、各細胞の代

謝亢進作用を有し、尚且つ、過剰に生成された、ORを除去する作用を有することである。

つまり、第6表中において得られた成績結果をもとに、これを総合的に評価すれば、本抽出物の有する作用は、単なるOR捕捉除去剤としての機能を有することのみならず、「細胞賦活能、及び免疫賦活能を有したOR捕捉除去剤」であることが大きな特長である。

[5] 発明の効果

従来から、ORの生成に対して、そのスカベンジャーとして働く物質が知られている。しかし、その多くは、細胞の代謝に対しては、全く影響(反応)を示さないか、あるいは代謝活性を若干低下させるもののが多かつた。

これに対して、本発明によるオウゴン抽出物については、第3～6表をもつて、その両機能に対して、著明な働きを示すことがわかつたのである。このような両機能に対して有効に働く物質は、きわめて限られていたが、本発明は、これによつて、オウゴンの有効利用を、さらに拡大することが可能となつた。

本発明による実際の医薬又は化粧品等への応用に当つては、その投与量としては、第3～6表等に示すデータをもつてすれば、臨上は、 10^{-5} ～ $10^{-4}M$ 濃度が、至適有効濃度と推定される。

これに従えば、前記で示した抽出物(オウゴンエキストラクトパウダー)のみならず、前記第1表中に示される抽出法、あるいは、その他の方法を用いて得られたところの、オウゴン抽出物も利用可能である。但し、その際には、オウゴン由來のフラボノイドとして、バイカレインを含むことが必須であるが、その他のオウゴン由來の成分が含まれていても良い。

又、製剤化上は、大変有利な条件をもつてゐる、すなわち、公知、OR捕捉除去を目的となし、提案されているものには、SODがあるが、熱安定性、水の系における溶解後の安定性に、著しく欠け、これを解決するための策として、例えば、リポソーム化、マイクロカプセル化等の製剤化法が、種々検討されてきている。しかしながら、SODの反応性の早さ、あるいは、これにともなう持続性の保持の面から、未だ充分な製剤化には至つていないのが現況であつた。

したがつて、現在、SODに代替可能な、OR捕

捉除去機能を有した物質が求められてきたが、それに適応出来る物質となれば、これまで、きわめて少なかつたのである。すなわち、本発明において、前表(第3～5表)、さらに第6表に示すごとく、共に著明な効果を有する物質となると、さらに限定され、これまで、製剤化上の安定性もさることながら、実用的なOR捕捉除去剤の開発は、困難であつた。

これに対し、本発明による抽出物は、その粉体として得られたものは、熱安定性に優れ、密栓下で遮光保存すれば、長期間にわたり安定であること。又、さらに、製剤化(配合)における安定性については、例えば、前表(第1表)中に示す刊行物(イ)によれば、その処方中の系においても安定であり、外用塗布塗擦剤(化粧品類等の処方)中にも、容易に配合して用いることが出来ることなど、大きなメリットがある。

尚、処方中の系では、PHを酸性側で製剤化することが、一つのポイントとなる。

すなわち、本発明による抽出物は、単なるOR捕捉除去剤ではなく、第6表に示すごとく、細胞賦活能に優れており、その利用分野は、細胞賦活剤としての機能を發揮し、免疫賦活剤としての機能も有していることである。

従つて、その応用は、前記(2)の(A)～(E)で示した如くの疾患や、さらに、例えば各種の癌の予防と治療、あるいは、老化防止を目的とした各種の薬剤、又、化粧品などの外用塗布などの形態の剤にあつては、シミ、ソバカス、シワの防止に有効であり、又、頭髪に対しては、脱毛を防ぎ、育毛、あるいは発毛を促進させ、とくに、既知抗癌剤、その他の治療剤の投与による、脱毛現象の発症にあたつては、これを防ぐことが出来る。

本発明者は、多くの天然産物(動・植物)を出发原料として選び、コツコツと地道に検索を続け、ここに他に例を見ない、優れたOR捕捉除去剤を開発するに至つたが、本発明が引き金となつて、今後は、バイカレインの有する構造上の特徴である、フラボン、フラボノイド骨格を有する、他の植物系成分、あるいは動物系成分をもとにした、OR捕捉除去剤としての開発が、一段と活発になるものと予想され、そのもたらす効果は、大きいものがあると考えられている。

17

図面の簡単な説明

第1図は、明細書の詳細な説明の欄中、〔4〕発明の構成の項の(B)で示す抽出法によつて得られた、オウゴン抽出物(オウゴンエキストラクトバ

18

ウダー)が有する、液体クロマトグラフーによるチャートである。第1図中、Aはバイカレイン、Bはオウゴニン。

第1図

